

15. 遺伝子解析室

室長 神田 忠仁

概要

遺伝子解析室では、遺伝子治療に用いるウイルスベクターの研究とウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索、解析に関する業務を行うこととされている。

遺伝子治療は、先天性遺伝病に対する根治療法になりうる。これまでに欧米及び我が国で行われた臨床試験では、重症複合免疫不全症に対して良好な治療効果が見られ、末期がん患者の QOL の改善や維持においても効果を発揮している。前臨床試験では、血友病や糖尿病の治療に有効性が示されている。今後、遺伝子治療がさらに発展し、真に実用的な治療技術となるためには、遺伝子導入効率を一層高めるとともに、導入遺伝子の安定な発現と発現量や発現時期の調節を可能にする技術の開発が求められ、これらの機能を持つ高性能ウイルスベクターの開発が各国で進められている。一方、米国でのアデノウイルスベクターによる患者の死亡やフランスでのレトロウイルスベクターによる白血病の発症が示すように、いわば人工のウイルスであるベクターの臨床応用では、ベクターの安全性確保が重要な課題である。我々は、我が国での遺伝子治療臨床試験のリスク管理に役立つため、内外のウイルスベクターの安全性、有効性に関する情報収集に努めた。また、今後、遺伝子治療への応用が期待されているアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクターの研究を進めた。

15 種のヒトパピローマウイルス(HPV)が発がん性を持つ。これらの高リスク HPV の感染は子宮頸癌を中心に世界の女性の癌の 11%の原因とされている。HPV は、性行為等で生じた粘膜の微少なキズから侵入し、表皮基底細胞(幹細胞)の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が最終分化を始めると HPV ゲノムの複製と HPV 蛋白質の大規模な発現が起こり、子孫ウイルスが形成されて周辺に放出される。このような HPV 潜伏・持続感染の成立と維持を支える角化細胞の分化の機構を解析し、HPV を排除する方法を検討している。現

在、欧米で開発されている HPV ワクチンは 16 型、18 型のみを感染を予防するもので、他の型には効果がない。我々は、発がん性 HPV 群の感染を一括して予防できるワクチン抗原の開発を目指している。

HIV のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対する耐性株は、逆転写酵素に変異を持つ。変異が逆転写酵素の構造と機能をどのように修飾するのかを知るために、逆転写酵素の結晶化と計算科学による解析を継続した。

臓器移植は実用的な医療技術として発展している。しかし、移植用臓器の不足は深刻で、待機患者が移植を受けられずに死亡することも多い。そこで、動物臓器を利用する異種移植の研究が進められている。我が国でも、ヒトの補体による拒絶反応を軽減できる遺伝子改変ブタが開発されている。しかし、異種移植では、ドナー動物由来感染症が生じる可能性があり、いったんヒトでの増殖能を獲得した病原体による感染の拡大が危惧されている。特に内在性レトロウイルスは、ドナー動物の飼育管理では排除でき無い。今年度から、ブタの内在性レトロウイルスに関する研究を開始した。

業績

調査・研究

I. 遺伝子治療に用いるウイルスベクターに関する研究

1. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの開発及び安全性評価のための基礎的研究

(1) AAV10 型、11 型ベクターの体内動態の解析

AAV10 型、11 型ベクターの安全性、体内動態をカニクイザルで調べた。ベクターが持つ EGFP 遺伝子の異なる位置に HindIII 認識部位を導入し、PCR 産物を HindIII で切断すればどちらのベクター由来断片が分かるよう工夫した。AAV2、10、11 型ベクターを 10^{10} ゲノムコピーずつ混ぜ、5 頭のカニクイザルに大腿静脈から接種した。3 ないし 7 ヶ月後に解剖し、各臓器のベクターゲノムを調べた。脾臓、リンパ節などのリンパ系組織

遺伝子解析室

には、各血清型のベクターゲノムが存在した。肝臓では 2、10 型ベクターが検出されたが 11 型ベクターは検出されず、血清型によって臓器指向性が違っていた。一頭では 2、10 型ベクターは検出されるものの、11 型ベクターは全ての臓器に検出されず、各血清型ベクターに対する感受性に個体差があった。ベクターが検出された臓器に異常な病理所見は無く、どの血清型のベクターも粒子そのものの毒性は極めて低いことがわかった。(森清一郎、神田忠仁、佐多徹太郎 [感染病理])

(2) AAV ベクターの感染における細胞表面糖鎖の役割

COS-1 細胞表面をヘパリナーゼないしコレラ菌シアリダーゼで部分消化した後に、AAV2、4、8、10、11 型ベクターの感染の有無を調べた。また、O 結合型グリコシレーションの特異的阻害剤を添加した培養液で増殖させた COS-1 細胞へのベクターの感染を調べた。ヘパリナーゼ処理により 2 型ベクターの感染性は著しく低下したが、4、8、10、11 型ベクターの感染性に影響はなかった。コレラ菌シアリダーゼで処理した場合、4 型ベクターの感染は強く阻害され、8、10 型ベクターの感染は部分的に阻害された。2、11 型ベクターの感染には影響がなかった。O 結合型グリコシレーションを阻害された COS-1 細胞への 4 型ベクターの感染は低下した。血清型により、感染に使用する細胞表面の糖鎖の種類が異なることがわかった。(森清一郎、神田忠仁)

2. 新たなウイルスベクターの開発に関する研究

(1) AAV 組み込み標的部位(AAVS1)に存在するインシュレーターの解析

導入遺伝子が染色体のどの部位に組み込まれても、安定な長期発現を可能にするには、ウイルスベクターにインシュレーターを組み込む必要がある。ヒト 19 番染色体 AAVS1 領域内に見出したインシュレーターの解析を継続した。DNA を細分化して各断片のエンハンサープロモーター活性を調べ、活性を担う 27 塩基長の 2 つの独立した領域を明らかにした、in vitro の試験でこの領域には、ニワトリの グロビンインシュレーターに結合する CTCF は結合せず、AP2 が結合することがわかった。(緒方敏彦、神田忠仁)。

(2) HPV ベクターの作製

HPV52、58 型キャプシドに発現プラスミドを組み込んだベクターを開発した。HPV キャプシド蛋白質(L1、L2)は、通常の動物培養細胞で発現しないので、HPV52、58 型 L1 及び L2 遺伝子のアミノ酸配列を変えずに塩基配列を変えたコドン変異体を作製した。コドン変異体を 293TT 細胞に導入すると、効率よくキャプシドが形成された。SV40 複製開始点を持つレポータープラスミドを L1、L2 発現プラスミドと共に 293TT 細胞に導入すると、細胞で複製したレポータープラスミドがキャプシドに取り込まれ、感染性のベクターとなった。HPV キャプシドの抗原性は型特異性が極めて高いので、HPV の異なる型のベクターは繰り返し投与が必要な遺伝子治療戦略に適している。また、このベクターは、HPV ワクチンの有効性を評価する感染中和系に利用できる。(越智寛幸、神田忠仁)

II. HPV に関する研究

1. HPV の増殖制御機構の研究

(1) CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) による HPV16 型 P670 プロモーターの活性化

HPV 遺伝子の転写は、感染角化細胞の分化に同調して制御されている。そこで角化細胞の分化を引き起こす転写因子 C/EBP が HPV16 型遺伝子の転写に及ぼす効果を調べた。初期プロモーター P97 及び後期プロモーター P670 の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポータープラスミドを作り、C/EBP 発現プラスミドと共に HeLa 細胞またはヒト包皮角化細胞に導入した。C/EBP は P97 からの転写を抑制し、P670 からの転写を促進した。組換え C/EBP 蛋白質を大腸菌で作成し、P670 領域の DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイを行い、P670 近傍に 2 ヶ所の C/EBP 結合部位を同定した。C/EBP が結合できない塩基置換変異を導入した P670 リポーターは C/EBP に対する応答性が減弱した。さらにクロマチン免疫沈降法により、C/EBP がこの 2 ヶ所の部位に細胞内で結合することが分かった。C/EBP は HPV ゲノムの P670 に直接結合し、分化特異的な転写調節に関わることが示された。(柗元 巖、神田忠仁)

(2) HPV16 型後期プロモーター (P670) 制御因子の研究

遺伝子解析室

P670 の活性制御に関わるシス因子を探索した。HPV16DNA の E1 遺伝子領域をルシフェラーゼ遺伝子に置換し、P670 からの転写をモニターするレポータープラスミドを作った。このプラスミドの P670 周辺領域の塩基を 20 塩基ずつ置換した変異体を作り、HeLa 細胞に導入して転写活性を比較した。2 つの領域では、変異によって転写活性が上昇した。この領域を標的とする抑制因子との結合が変異によって阻害され、抑制が解除されたと考えられた。結合領域の塩基配列から YY1 と CDP が抑制因子の候補となったが、ゲルシフト法で結合を調べると、YY1 は結合せず、CDP の結合が確認できた。CDP が P670 の周辺領域へ結合し P670 の活性を抑制していることが示唆された。(佐藤香央里、竹内隆正、神田忠仁)

(3) ヒト表皮角化細胞の分化時に誘導される転写因子の解析

HPV や AAV はヒト表皮角化細胞を宿主とし、その分化に伴って増殖する。その分子機構を知る基盤情報を得るため、初代ヒト表皮角化細胞の分化における遺伝子発現変動を調べた。リアルタイム PCR によって既知の分化マーカーの誘導を確認した上で、マイクロアレイを用いた mRNA 発現解析を行った。複数のマイクロアレイ解析で共通して変動が見られた遺伝子を選び、さらに蛋白質コード領域全長の PCR により発現亢進を確認し、リアルタイム PCR による定量を行った。表皮角化細胞の分化では、既に報告されている転写因子の他にも、複数の転写因子が誘導されることがわかった。これらの転写因子がウイルス遺伝子の発現に及ぼす影響を解析する。(竹内隆正、神田忠仁)

2. HPV ワクチン開発に関する研究

(1) 新たな中和エピトープに関する研究

HPV の L2 蛋白質 (473 アミノ酸) の親水性領域に相当する複数の合成ペプチドをウサギに免疫し、得られた抗血清の感染阻害活性を調べた。アミノ酸 28-42 及び 64-81 領域に対する抗体は、ほぼ全ての発がん性 HPV 群のキャプシドに結合した。さらに、HPV16、18、58 型偽ウイルスを中和した。全ての発がん性 HPV L2 蛋白質のこの領域のアミノ酸配列は、極めて良く保存されて

いる。これまでに見出した 108-120 領域に加え、これらのエピトープも、発がん性 HPV 群の感染を一括して予防できるワクチン抗原に応用できる。(近藤一成、神田忠仁)

(2) 中和エピトープを含む領域の機能に関する研究

HPV L2 蛋白質のアミノ酸 64-81 領域に中和エピトープが存在することがわかったので、この領域に変異を導入した偽ウイルスを作製し、感染性の変化を調べた。69 番目のリジン及び 72 番目のチロシンをアラニンに置換した変異体 (R69A 及び Y72A) の感染価は、野生型の 63、78% であった。この 2 つの変異を導入した R69A/Y72 の感染価は 53% に減少した。変異体のキャプシド構成とパッケージされたプラスミドの量、ヒト 293TT 細胞への吸着能は野生型と変わらなかった。従って、R69 および Y72 は細胞吸着後の感染経路で重要な役割を果たしていると推察される。中和抗体の結合はこの機能を阻害するらしい。

(石井克幸、近藤一成、越智寛幸、神田忠仁)

III. HIV に関する研究

1. HIV-1 薬剤耐性に関する研究

(1) HIV-1 薬剤耐性発現の分子機構

これまでに HIV-1 逆転写酵素 (RT) に多剤耐性を与える変異セット (3-4 ループの 11 アミノ酸挿入変異を含む) を同定した。これらの変異セットによる RT 機能の変化を精製 RT 標品の反応速度解析と RT 立体構造の計算科学解析により調べた。逆転写反応が進行する生理的環境下では耐性発現に必要な trans-acting 因子が存在すると考え、種々の細胞質因子を検討した結果、ヌクレオチド 2 リン酸とヌクレオチド 3 リン酸が多剤耐性変異と協調して酵素の高度耐性を誘導することを見出した。また、ATP は RT のアロステリック調節因子として基質選択性を調節する働きがあることを見出した。RT の立体構造モデルを統合計算化学システム (MOE) によって構築し、結合シミュレーションにより ATP 結合部位を予測した。(横山勝、守宏美、佐藤裕徳)

(2) 薬剤治療時における HIV-1 変異率変動の分子機構

多剤併用治療に用いられる種々の RT 阻害薬、RT の

薬剤耐性変異、並びに RT 阻害薬と耐性変異の組み合わせが、ウイルス複製時の変異頻度に与える影響を解析した。大部分の RT 阻害薬と耐性変異は変異率を昂進し、一部の耐性変異は変異率を低下させること、RT 阻害薬と耐性変異の組み合わせは概ね相加的効果をもつことを見出した。RT の分子モデルでは、dNTP は RT 活性中心ではなく、フィンガードメインの 3 4 ループに最も安定に結合することが予測された。基質結合によりフィンガードメインの構造変化が誘導され、基質がより安定な活性中心に再配置されると推定される。個々の RT 阻害薬および薬剤耐性変異が基質の初期基質の初期結合および induced-fit による活性中心への転移過程に与える影響を、RT の立体構造モデルに基づき検討した。全ての実験結果は上述の induced-fit モデルで矛盾無く説明できた。(横山勝、佐藤裕徳、Louis M Mansky [University of Minnesota])

2. HIV-1 Env Gp41 変異による膜融合活性変化の分子機構に関する研究

HIV-1 の標的細胞への結合と膜融合には外被蛋白質 Env の Gp41 が関与する。膜融合阻害薬に対する耐性株では Gp41 の 36 番目のアミノ酸に変異が生じる。そこで、高融合活性株由来の Gp41 エクトドメイン 3 量体 (G36 ; 36 位アミノ酸がグリシン) および低融合活性のそれ (D36 ; 36 位アミノ酸がアスパラギン酸) の分子モデルを構築した。D36 では、側鎖が相対する C ヘリックスに近接して、C ヘリックス上の複数の側鎖に囲まれた位置に配置し、アスパラギン酸側鎖が立体障害となって Gp41 の 6 ヘリックスバンドル形成が進まず、融合活性が低下するらしい。G36 では側鎖が短いため、C ヘリックスとの間に十分な距離を保つことができ、C ヘリックスの側鎖による囲いこみも無いと推定された。(横山勝、佐藤裕徳、木ノ本正信[感染病理]、徳永研三[感染病理])

IV. 異種移植の安全性に関する研究

ブタ内在性レトロウイルス (PERV) 研究

移植用臓器の不足を補うために、ヒトと大きさが近いブタ臓器の利用が計画されている。実際に臨床応用されると、PERV もしくはその変異ウイルスによる感染症が生じる可能性がある。そこで PERV の検出と安全性研究

の基盤整備を目的として、ブタ臓器から感染性 PERV の分離を試みた。移植用に開発中の遺伝子改変ブタの抹消血リンパ球と卵巣細胞をヒト細胞 (HeLa および 293)、ミンク細胞 (S+L-Mink)、ブタ細胞 (PK15 および ST-IOWA) と 5-10 日間共培養した後、リンパ球と卵巣細胞を除去し、継代培養を 2 ヶ月続けた。経時的に培養上清の Mn⁺⁺依存性逆転写酵素活性を測定した。その結果、293 を除く全ての試料に酵素活性を検出した。活性はブタ細胞、S+L-Mink、HeLa の順で高く、共培養後約 2 月の間、同レベルで持続した。(佐藤裕徳、中村浩美、神田忠仁)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., and Kanda, T.: Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology*, 330:375-383,2004.
- 2) Enomoto, Y., Enomoto, K., Kitamura, T., and Kanda, T.: The keratinocyte-specific POU transcription factor hSkN-1a represses the growth of cervical cancer cell Lines. *Oncogene*, 23:5014-5022, 2004.
- 3) Motomura K, Toyoda N, Oishi K, Sato H, Nagai S, Hashimoto SI, Tugume SB, Enzama R, Mugewa R, Mutuluza CK, Mugweyi P, Nagatake T, and Matsushima K. : Identification of a host gene subset related to disease prognosis of HIV-1 infected individuals. *Int Immunopharmacol*. 4:1829-1836, 2004.
- 4) Kukimoto I, Elderkin S, Grimaldi M, Oelgeschlager T, Varga-Weisz PD. : The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding and assembly mediated by ACF. *Molecular Cell*,13, 265-277, 2004

2. 和文発表

- 1) 神田忠仁 : ヒトパピローマウイルス。分子予防環境医学、p216-225, 本の泉社。2004 年。

II. 学会発表

- 1) 神田忠仁: ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチンの開発。第 14 回国立感染症研究所シンポジウム。(2004 年 5 月、東京)
- 2) 森清一郎、竹内隆正、神田忠仁: アデノ随伴ウイルス (AAV)9、10 型ゲノムの分離とベクターへの応用。第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月、横浜)
- 3) 近藤一成、石井克幸、神田忠仁: 高リスク HPV 群の感染を予防するワクチン抗原。第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月、横浜)
- 4) 徳永研三、木ノ本正信、横山勝、佐藤裕徳、倉田毅、佐多徹太郎: サブタイプ A/G 組換え型 HIV-1 ガーナ分離株のプロテアーゼ阻害剤に対する低感受性。第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月、横浜)
- 5) 木ノ本正信、横山 勝、佐藤裕徳、生田和良、佐多徹太郎、徳永研三: 高融合活性を規定する Env 領域のアミノ酸の同定および機能・構造解析。第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月、横浜)
- 6) L. Myint, Y. Tomita, H. Sato, M. Nishizawa, M. Fujino, N. Yamamoto & W. Sugiura: Impairment of intracellular Gag transport and virion assembly in protease inhibitor resistant human immunodeficiency virus type 1. 第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月、横浜)
- 7) 藤秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、有吉紅也、星野忠次、佐藤裕徳、横幕能行: HIV-1 env の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システム構築。第 52 回日本ウイルス学会総会 (2004 年 11 月、横浜)
- 8) 横山勝、木ノ本正信、徳永研三、佐多徹太郎、長縄聡、北村勝彦、蜂谷敦子、岡慎一、服部知秀、田中真理、横幕能行、有吉紅也、星野忠次、仲宗根正、佐藤裕徳: 計算科学の HIV-1 研究への適用に関する基礎研究。(第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月、静岡)
- 9) 富田康浩、Wadchara Pumpradit、Nuanjun Wichukchinda、Panita Pathipvanich、Pathom Sawanpanyalert、草川茂、武部豊、巽正志、田中真理、横山勝、有吉紅也、佐藤裕徳: HIV-1 CRF01_AE R5 ウイルス株 NH2 に固有の抗体回避機構。(第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月、静岡)
- 10) 長縄聡、富田康浩、横山勝、鈴木健之、白井輝、上田敦久、岳野光洋、武部豊、加藤佳代子、椎野禎一郎、朽久保修、石ヶ坪良明、北村勝彦、佐藤裕徳: HIV-1 CRF01_AE R5 ウイルス V3 配列に起因する抗体回避機構。(第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月、静岡)
- 11) 藤秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、星野忠次、有吉紅也、星野洪郎、佐藤裕徳、横幕能行: HIV-1 env クローンライブラリー作成の試み-HIV-1 env の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システム構築。(第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月、静岡)
- 12) 徳永研三、木ノ本正信、横山勝、佐藤裕徳、倉田毅、佐多徹太郎: 「西アフリカ未治療患者由来 HIV-1 株のプロテアーゼ阻害剤に対する低感受性」。(第 27 回日本分子生物学会、2004 年 12 月、神戸)